

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 janvier 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/00025 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: **A01N 43/16**

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01761

(22) Date de dépôt international: 23 juin 2000 (23.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/08135 25 juin 1999 (25.06.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
CENTRAL NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **LIENART, Yvette** [FR/FR]; Saint Nizier d'Uriage, F-38410 Uriage (FR). **HEYRAUD, Alain** [FR/FR]; 6, côte de Verdaret, F-38113 Veurey-Voroize (FR). **SEVENOU, Olivier** [FR/GB]; 1 Hight Street, Kegworth DE74 2DA (GB).

(74) Mandataires: **DEMACHY, Charles** etc.; Grosset-Fournier & Demachy SARL, 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF GLYCURONIC POLYSACCHARIDES AND OLIGOSACCHARIDES AS PHYTOSANITARY PRODUCTS AND/OR FERTILISERS

(54) Titre: UTILISATION DE POLYSACCHARIDES ET D'OLIGOSACCHARIDES GLYCURONIQUES EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET/OU FERTILISANTS

(57) Abstract: The invention concerns the use of compounds selected among 1,4 β -D-glucuronans, and/or glycuronic polysaccharides derived from polymers of formula (I), and whereof the number of saccharide units is less than about 30, and/or esters and/or ethers corresponding to polymers of formula (I) or said oligosaccharide derivatives, as phytosanitary products in applications related to their activity for amplifying the 1,3 β -D-glucanase enzyme; and/or as biofertilisers in applications related to their activity amplifying the 1,3 β -D-glucanase enzyme, and/or the 1,4 β -D-glucanase, and/or the xyloglucan endotransglycolase.

(57) Abrégé: L'invention a pour objet l'utilisation de composés choisis parmi les polymères 1,4 β -D-glucuronanes, et/ou les oligosaccharides glycuroniques dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30, et/ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés, en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou en tant que biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme 1,4 β -D-glucanase, et/ou de la xyloglucane endotransglycolase.

WO 01/00025 A1

UTILISATION DE POLYSACCHARIDES ET D'OLIGOSACCHARIDES GLYCURONIQUES EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET/OU FERTILISANTS

5

La présente invention a pour objet l'utilisation de polymères 1,4 β -D-glucuronanes, et d'oligosaccharides glycuroniques dérivés, en tant que produits phytosanitaires et/ou fertilisants.

10 L'enzyme 1,3- β -D-glucanase est un marqueur de réactions de défense chez les végétaux. Au cours de réactions d'hypersensibilité à un pathogène (bactéries, champignons, virus) la plante réagit en induisant la synthèse de protéines spécifiques nommées "PR-protéines" (Sintzi A. et al. (1993) Biochimie, 75, 687-706). Ces protéines liées à la pathogénèse concourent, avec d'autres molécules (comme l'acide salicylique) au développement d'une résistance au pathogène. Selon leurs propriétés biochimiques, et leur
15 fonction physiologique, ces protéines sont répertoriées en plusieurs groupes. Elles présentent, en commun, les caractéristiques suivantes: bas poids moléculaire, composition le plus souvent monomérique, leur résistance à la protéolyse, leur stabilité en milieu acide ou à des températures extrêmes, leur association à des membranes plasmiques ou endoplasmiques, leur localisation pariétale. Parmi, ces PR-protéines se situe le groupe 2
20 composé d'enzymes 1,3 β -D-glucanases, qui reconnaissent comme substrats des chaînes 1,3 β -D-glucanes. Le rôle de ces protéines dans la défense de la plante repose sur leur capacité à lyser les parois des pathogènes riches en 1,3 β -D-glucanes (Boller T. (1993) In mechanisms of Plant defenses responses. Fritig B. Legrand M. eds. Kluwer. Academic Publishers Dordrecht, 391-400.

25 Cependant, cette activité enzymatique n'est pas seulement impliquée dans la défense des plantes. En effet, elle peut être régulée par des phytohormones et elle peut être induite à certains stades de développement de la plante. A ce titre, l'enzyme 1,3- β -D-glucanase est un marqueur de croissance et/ou de différenciation cellulaire chez les végétaux.

30 Cette enzyme comme d'ailleurs un certain nombre de PR-protéines (inhibiteurs de protéase, chitinases, protéines régulant l'expression de gènes codant pour l'osmotine) sont associées à la croissance et/ou à la différenciation cellulaire ou bien à des processus

d'adaptation à l'environnement. Certaines de ces protéines sont reconnues par des anticorps dirigés contre des 1,3- β -D-glucanases isolées du tabac contaminé par la mosaïque du tabac (Kauffmann et al. (1990) Plant Mol. Biol., 14(3) : 381-90).

Des activités 1,3- β -D-glucanases ou les gènes codant pour ces protéines sont induit(e)s au cours de la germination, du développement des bourgeons floraux, des fruits (del Campillo E., Lewis L.N. (1992) Plant Physiology 99, 1015-1020; Neale et al. (1990) Plant Cell 2, 7, 673-684). En particulier, ces réponses se développent dans des tissus en voie de remaniements cataboliques (endosperme, tubes polliniques, zones d'abscission de tiges, de pédoncules..) ou en période de division mitotique (cas des anthères, des stigmas, de tiges). Elles sont sous dépendance hormonale (auxines, cytokinines en général, acide abscissique en particulier), et des molécules comme l'éthylène, contrôlant la maturation des fruits, ou l'acide salicylique, contrôlant la floraison, sont également des inducteurs. Enfin, des enzymes 1,3 β -D-glucanases ont été répertoriées pour des fonctions d'adaptation de la plante au froid et à des teneurs élevées en ozone (Hinch et al. (1997) Plant physiology 114, 1077-1083).

L'enzyme 1,4- β -D-glucanase est un marqueur de croissance et/ou de différenciation cellulaire chez les végétaux. Cette enzyme reconnaît comme substrat des chaînes linéaires de glucanes liés en β (1,4). Elle peut hydrolyser la cellulose, des glucanes β (1,4) (1,6), le xyloglucane. Ainsi, elle intervient dans les remaniements ultrastructuraux des parois des cellules végétales en cours de croissance. Son induction et/ou celle des gènes spécifiques se déclenchent au cours des processus impliquant la lyse des parois végétales, rupture des anthères, zones d'abscission de fruits, de fleurs (Hayaschi T., Oshimi C. (1994) Plant Cell Physiology 35(3), 419-424; Brummel D.A. et al. (1997) Plant Biol. Mol. 33, 1, 97-195). Elle est contrôlée par l'éthylène, par des hormones comme l'acide abscissique ou l'auxine.

L'activité xyloglucane endotransglycolase induit la modification des xyloglucanes des parois des cellules végétales en réponse à des stimuli environnementaux tels que la pression mécanique, le vent, l'obscurité, et les chocs thermiques (Xu et al. (1996) Plant J. 9(6), 879-89; Antosiewicz et al. (1997), 115(4), 1319-28).

La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs du fait que les polymères 1,4 β -D-glucuronanes et les oligosaccharides glycuroniques dérivés de ces derniers, ont des activités d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme

1,4 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme xyloglucane endotransglycolase, et, à ce titre, sont désignés composés "éliciteurs", susceptibles d'être utilisés dans le cadre d'applications phytosanitaires ou de fertilisation.

Les polymères 1,4 β -D-glucuronanes ont déjà été décrits dans le brevet français FR-B-2 688 222 du 3 mars 1992, dans des domaines d'utilisation totalement différents de ceux susmentionnés de la présente invention, à savoir dans les domaines alimentaire, pharmaceutique en thérapeutique humaine ou vétérinaire, cosmétique ou de l'épuration des eaux, en particulier en tant que moyen gélifiant, épaississant, hydratant, stabilisant, chélatant ou floculant, ainsi que dans la préparation d'oligosaccharides.

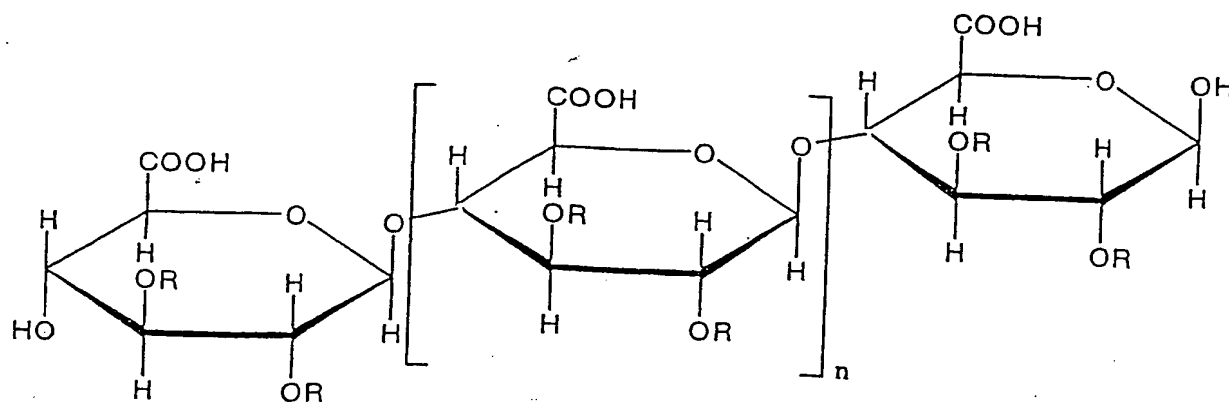
La présente invention a pour but de fournir des composés utilisables en tant "qu'éliciteurs" entrant dans la composition de fertilisants (engrais, fertilisants biologiques ou biofertilisants), et de produits phytosanitaires.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouveaux biofertilisants utilisables notamment comme stimulants de la nutrition en complément ou en remplacement de produits commerciaux à base de potasse et de nitrates toxiques pour l'environnement, et/ou comme régulateurs d'une ou plusieurs étapes du développement des plantes.

Un autre but de la présente invention est de fournir de nouveaux produits phytosanitaires utilisables notamment comme activateurs des réactions de défense et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques en complément ou en remplacement de pesticides toxiques pour l'environnement.

La présente invention a pour objet l'utilisation de composés choisis parmi :

- les polymères 1,4 β -D-glucuronanes de formule (I) suivante :



dans laquelle n est un nombre entier pouvant atteindre jusqu'à environ 2500, avantageusement n est compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou $COCH_3$,

- et/ou les oligosaccharides glycuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15,

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés,

* en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase,

* et/ou en tant que biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme 1,4 β -D-glucanase, et/ou de la xyloglucane endotransglycolase.

Parmi les plantes susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer la vigne, les arbres fruitiers, les cultures céréalières et maraîchères ou tout autre végétal d'intérêt économique.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des composés choisis parmi ceux cités ci-dessus, en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, telles que la protection des plantes contre des pathogènes ou des prédateurs, notamment contre les bactéries, virus, champignons, insectes, nématodes, ou l'adaptation des plantes à un stress abiotique, notamment l'adaptation au froid ou à des teneurs élevées en ozone.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation, à titre de produits phytosanitaires, des polymères 1,4 β -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H .

L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation en tant que produits phytosanitaires, des polymères 1,4 β -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, R représente H ou $COCH_3$, le pourcentage de $COCH_3$ en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

L'invention concerne également l'utilisation en tant que produits phytosanitaires, des oligosaccharides glycuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$, tels que les oligo 1,4 β -D-

glucuronanes, les oligo 1,4 β -D-mannuronanes, et les oligo 1,4 β -D-guluronanes, dont le DP (degré de polymérisation) est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

On entend dans ce qui suit par l'expression "oligosaccharide de degré de polymérisation x (DPx)" des oligosaccharides constitués du même nombre x d'unités saccharidiques, et par l'expression "oligosaccharide de degré de polymérisation moyen x (DP moyen x)" des oligosaccharides constitués d'un nombre variable d'unités saccharidiques et dont la moyenne correspond au nombre x.

Des dérivés oligosaccharidiques glycuroniques préférés en tant que produits phytosanitaires, sont choisis parmi les suivants :

- les oligo 1,4 β -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4 β -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4 β -D-guluronane de DP4.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement de plantes avec des polymères 1,4 β -D-glucuronanes et/ou des oligosaccharides glycuroniques tels que définis ci-dessus, en vue de l'obtention de plantes résistantes aux pathogènes susmentionnés ou adaptées à un stress abiotique, notamment au froid ou à des teneurs élevées en ozone.

L'invention concerne également l'utilisation des composés choisis parmi ceux cités ci-dessus, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme 1,4 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme xyloglucane endotransglycolase.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des oligo 1,4 β -D-glucuronanes, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et de l'enzyme 1,4 β -D-glucanase, notamment dans le cadre du contrôle d'une ou plusieurs étapes de développement des plantes, tels que le contrôle de la maturation des fruits, de l'abscission, de la croissance du pistil ou de la maturation des anthères.

L'invention a encore plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des oligo 1,4 β -D-glucuronanes de DP8 et de DP moyen 8, en tant que produits biofertilisants.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des oligo 1,4 β -D-mannuronanes, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme xyloglucane endotransglycolase, notamment dans le cadre du contrôle de l'organisation des parois cellulaires au cours de l'expansion des tissus (zones vasculaires ou parenchyme) de certains organes tels que les hypocotyles, les cotylédons, les feuilles, les tubes polliniques, et les fruits, et pour renforcer les parois végétales et les adapter à des stimuli environnementaux tels que le vent, le choc thermique ou hydrique, ou la pression mécanique.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement de plantes avec des oligosaccharides glycuroniques tels que définis ci-dessus, en vue de l'obtention de plantes dont une ou plusieurs étapes de développement, telles que la maturation des fruits, l'abscission, la croissance du pistil, ou la maturation des anthères, sont contrôlées dans le temps.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement de plantes avec des oligosaccharides glycuroniques tels que définis ci-dessus, en vue de l'obtention de plantes dans lesquelles l'organisation des parois cellulaires au cours de l'expansion des tissus est contrôlée, et dont les parois végétales sont renforcées afin de les adapter à des stimuli environnementaux tels que le vent, le choc thermique ou hydrique, ou la pression mécanique.

L'invention concerne également les produits phytosanitaires et/ou biofertilisants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un composé choisi parmi :

- les polymères 1,4 β -D-glucuronanes de formule (I) susmentionnée dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou COCH_3 ,
- et/ou les oligosaccharides glycuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,
- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés.

L'invention a plus particulièrement pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un polymère 1,4 β -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

L'invention concerne également les produits phytosanitaires comprenant au moins un polymère 1,4 β -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, R représente H ou COCH₃, le pourcentage de COCH₃ en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

L'invention a également pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un oligosaccharide glycuronane à enchaînement β (1-4), tels que les oligo 1,4 β -D-glucuronanes, les oligo 1,4 β -D-mannuronanes, et les oligo 1,4 β -D-guluronanes, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

L'invention a plus particulièrement pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un dérivé oligosaccharidique glycuronique choisi parmi les suivants :

- les oligo 1,4 β -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4 β -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4 β -D-guluronane de DP4.

L'invention concerne plus particulièrement les produits biofertilisants comprenant au moins un oligo 1,4 β -D-glucuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, et, de préférence, les produits biofertilisants comprenant les oligo 1,4 β -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8.

L'invention concerne plus particulièrement encore les produits biofertilisants comprenant au moins un oligo 1,4 β -D-mannuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, et, de préférence, les produits biofertilisants comprenant l'oligo 1,4 β -D-mannuronane de DP4.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la préparation des polymères 1,4 β -D-glucuronanes et oligosaccharides glycuroniques dérivés selon l'invention, ainsi que de la mise en évidence de leurs propriétés d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme 1,4 β -D-glucanase.

A) Préparation des polymères uroniques et/ou de leurs oligosaccharides

L'obtention des polymères 1,4 β -D-glucuronanes fait appel à des procédés de fermentation de souches bactériennes isolées de la rhizosphère (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* ...), modifiées ou non par mutations chimiques et/ou manipulations génétiques.

Les polymères 1,4 β D-glucuronanes peuvent être aussi obtenus par oxydation sélective de la cellulose selon des procédés décrits dans différents articles (Painter T.J., 1977, Preparation and periodate oxidation of C-6-oxycellulose: conformational interpretation of hamylacetal stability. Carbohy. Res. 55, 95-103 ; Chang P.S. and Robyt J.F., Oxidation of primary alcohol groups of naturally occurring polysaccharides with 2, 2, 6, 6-tetramethyl-1-piperidine oxoammonium ion. J. Carbohydr. Chem., 15, 819-830 ; Isogai, A and Kato, Y., 1998, Preparation of polyuronic acid from cellulose by TEMPO-mediated oxidation, Cellulose, 5, 153-164)

Le cas échéant, les polymères ainsi obtenus sont modifiés et/ou dégradés par voies chimiques et/ou enzymatiques, en cours de fermentation ou par des traitements post-fermentaires.

- Polymère 1,4 β -D-glucuronane

A titre d'illustration, le polymère 1,4 β -D-glucuronane est obtenu par fermentation d'une souche mutée de *Rhizobium meliloti*, selon le protocole décrit dans le brevet français FR-B-2 688 222 du 3 mars 1992.

- Oligomère 1,4- β -D-glucuronane de DP moyen 8

Le polymère précédent natif, c'est à dire comportant au moins 50% d'unités glucuroniques acétylées en C2 et ou C3, est soumis à une hydrolyse enzymatique. L'enzyme est une glucuronate lyase d'origines diverses, notamment extraite de pancréas d'ormeaux, ou d'origine fongique (Dantas L. et al., Carbohydr. Res., 265.(1994) 303-310) ou une glucuronate lyase présente dans le milieu de culture de bactéries telles que les souches de Rhizobiaceae (Michaud P., et al., Int. J. Biol. Macromol. 21 (1997) 3-9). Le mélange d'oligosaccharides ainsi obtenu est déacétylé par traitement basique (NaOH 0,1M), puis fractionné en fonction du degré de polymérisation (DP) par chromatographie de

perméation de gel sur colonne de Bio-Gel P6 (Dantas L. et al., susmentionné).

- Oligomères 1,4 β -D-mannuronane et 1,4 β -D-guluronane de DP 4

Le polymère de départ est un alginate, copolymère linéaire des acides mannuronique (M) et guluronique (G) dont le rapport M/G et le mode d'arrangement dépendent de l'origine. L'alginate est choisi en fonction du type d'oligomères à préparer. L'hydrolyse se fait par voie enzymatique: une alginate-lyase d'orveau pour les oligo-1,4 β -D-mannuronane (Heyraud A. et al., Carbohydr. Res., 291 (1996) 115-126), une alginate-lyase d'origine bactérienne pour les oligo-1,4 β -D-guluronane (brevet FR 97 03218 du 11 mars 1997). Les différents oligosaccharides, séparés selon le DP par chromatographie de perméation de gel, sont ensuite purifiés selon leur structure par chromatographie ionique en chromatographie liquide haute pression selon le procédé décrit dans l'article de Heyraud et al., susmentionné.

B) Réponse 1,3- β -D-glucanase induite dans des protoplastes de *Rubus*.

Conditions expérimentales : (1) préparation de protoplastes à partir de suspensions cellulaires de *Rubus fruticosus* L.; (2) incubation ou non de n échantillons de 2.10^6 protoplastes en présence "d'éléciteur" (polymères 1,4- β -D-glucuronane et 1,4- β -D-galacturonane (400 μ g/L), oligomères 1,4- β -D-glucuronanes de DP moyen 8, 1,4- β -D-mannuronane de DP 4, et 1,4- β -D-guluronane de DP 4 (50 nM); (3) après 20 min, les protoplastes traités ou non font l'objet d'une extraction enzymatique. 2 μ g de protéines sont utilisées par essai enzymatique, et par temps d'incubation. La viabilité des protoplastes est maintenu à 95 % pour une durée d'expérimentation de 6h; le test de viabilité au bleu d'Evans utilisé vérifie l'intégrité du plasmalemm.

Méthodologie : la mesure de l'activité (1,3 β -D-glucanase) repose sur le dosage colorimétrique (test au ferricyanure) des unités réductrices du substrat (hexamère réduit de laminarine) libérées au cours de l'hydrolyse. A partir des cinétiques développées, on trace des courbes dont les équations permettent de calculer la vitesse de la réaction enzymatique. 2 cinétiques, au moins, sont développées par échantillon, et par "set" expérimental. En général, 8 cinétiques provenant d'échantillons de 2 "sets " indépendants sont, au moins, développées.

Résultats : l'activation enzymatique dans des protoplastes élicités est exprimée en % de l'activité dans les contrôles. Les résultats sont rapportés dans le tableau récapitulatif 1.

Tableau 1

"éliciteur"	activité (% contrôle)
a	145
b	128
c	100
d	122
e	146

Tableau 1: Analyse comparative des réponses (1,3-β-D-glucanase) induites par "l'éliciteur" (polymère 1,4-β-D-glucuronane (400 µg/L) (a), oligo 1,4-β-D-glucuronane de DP moyen 8 (50 nM) (b), polymère 1,4-β-D-galacturonane (400 µg/L) (c), oligo 1,4-β-D-mannuronane de DP 4 (50 nM) (d), oligo 1,4-β-D-guluronane de DP 4 (50 nM) (e).

L'analyse électrophorétique par SDS-PAGE des protéines composant les extraits enzymatiques a été réalisée. Le marquage de protéines sur empreintes par un sérum reconnaissant des 1,3-β-D-glucanases isolées du tabac contaminé par la mosaïque du tabac (Ori et al. (1990) EMBO J., 9(11), 3429-36) confirme la présence de PR-protéines.

L'oligomère 1,4-β-D-glucuronane de DP moyen 8 et le polyglucuronane, utilisés à une concentration nanomolaire, amplifie en 20 min d'un facteur 1.5 et 1.3 respectivement l'activité 1,3 β-D-glucanase dans des protoplastes végétaux. Parmi les autres produits testés, c'est l'oligo 1,4-β-D-guluronane de DP4 qui est le plus efficace.

C) Réponse 1,4-β-D-glucanase induite dans des protoplastes de *Rubus*.

Conditions expérimentales d'élicitation : identiques à celles rapportées ci-dessus.

BEST AVAILABLE COPY

Méthodologie : la mesure de l'activité (1,4 β -D-glucanase) repose sur le dosage colorimétrique (test au ferricyanure) décrit ci-dessus des unités réductrices du substrat (cellopentaose réduit) libérées au cours de l'hydrolyse.

Résultats : les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2

"éliciteur"	activité (% contrôle)
a	100
b	120
c	100
d	-
e	101

Tableau 2: Analyse comparative des réponses (1,4 β -D-glucanase) induites par "l'éliciteur" (polymère 1,4- β -D-glucuronane (400 μ g/L) (a), oligo 1,4- β -D-glucuronane de DP moyen 8 (50 nM) (b), polymère 1,4- β -D-galacturonane (400 μ g/L) (c), oligo 1,4- β -D-mannuronane de DP 4 (50 nM) (d), oligo 1,4- β -D-guluronane de DP 4 (50 nM) (e).

L'oligomère 1,4- β -D-glucuronane de DP moyen 8 utilisé à une concentration nanomolaire, amplifie en 20 min d'un facteur 1.2 l'activité 1,4 β -D-glucanase dans des protoplastes végétaux.

D) Réponse xyloglucane endotransglycosylase induite dans des protoplastes de *Rubus*.

Conditions expérimentales d'éllicitation. $2 \cdot 10^6$ protoplastes dans 1 ml de tampon Tris-HCl buffer (pH 4.8) sont incubés en présence ou non d'un éliciteur (50 nM) ou d'une hormone (50nM): oligomère mannuronane de DP4 ou oligomère glucuronane de DP8 ou gibbérelline GA_3 . Après 20, 40, 60, 100, 120 min d'interaction, les protoplastes sont récupérés par centrifugation, puis soumis à une extraction enzymatique.

BEST AVAILABLE COPY

Méthodologie : la mesure de l'activité XET s'effectue dans les puits de plaques de microtitration en 4 étapes. Étape 1 : immobilisation de l'accepteur, soit la néoglycoprotéine XXLG \approx BSA. Étape 2 : introduction du milieu réactionnel (extrait enzymatique XET (équivalent à 1 μ g de protéines) substrat marqué DIG, soit XG \approx DIG dans le tampon Tris-HCl, pH = 7, 25 mM). Étape 3 : immunomarquage selon la séquence anti DIG marqué peroxydase, anti- peroxydase marqué peroxydase. Étape 4 : dosage de l'activité peroxydase dans un tampon citrate-phosphate (50nM, pH 5,5).

L'activité peroxydase se mesure à 492 nm. 3 courbes au moins d'activité peroxydase sont tracées par condition expérimentale, et les expériences sont réalisées à partir de 3 suspensions de protoplastes. L'activité XET est mesurée par la pente (ΔA_{492}) de la courbe déduite par régression linéaire de 9 courbes de cinétique peroxydase.

Abréviations :

DIG : digoxygénine

XET : xyloglucane endotransglycosylase – XG : polymère de xyloglucane – XXLG: oligomère non fucosylé de xyloglucane

Résultats : les résultats sont indiqués dans la figure 1.

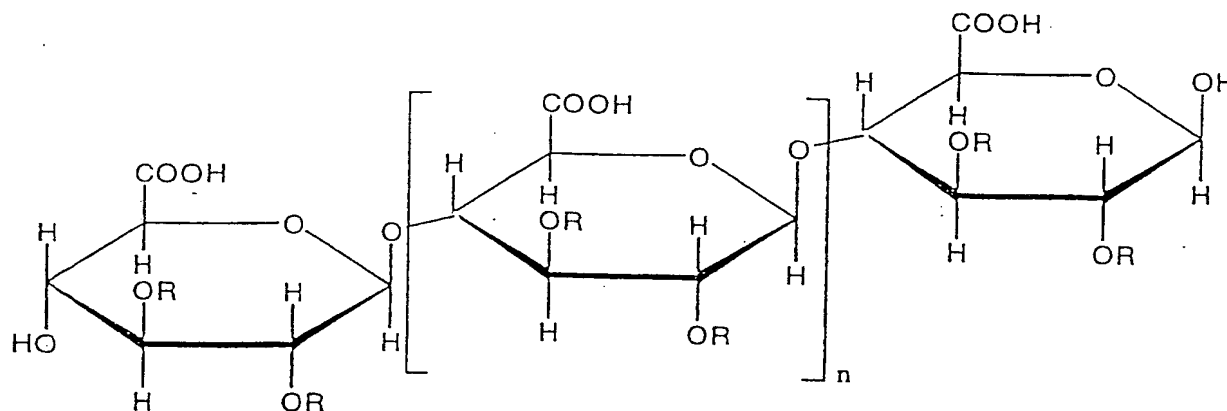
L'oligomère mannuronane de DP4 (MAN) induit la réponse XET la plus forte (amplification en 20 min d'un facteur 2.12) l'oligomère glucuronane de DP8 (GLUC) et l'hormone (GA3) sont moins efficaces (amplification en 20 min d'un facteur 1.62 et 1.12 respectivement). L'activité XET de référence est celle des protoplastes non élicités (TEMOIN).

Légende de la figure 1 : l'activité XET est indiquée en ordonnée en fonction du temps en abscisse ; la courbe suivant les triangles correspond aux résultats obtenus avec l'oligomère mannuronane de DP4 (MAN), la courbe suivant les croix correspond aux résultats obtenus avec l'oligomère glucuronane de DP8 (GLUC), la courbe suivant les ronds correspond aux résultats obtenus avec l'hormone (GA3), la courbe suivant les carrés correspond aux résultats obtenus avec le témoin.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de composés choisis parmi :

- les polymères 1,4 β -D-glucuronanes de formule (I) suivante :



dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou COCH₃,

- et/ou les oligosaccharides glycuroniques à enchaînement β (1-4) dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés,

* en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase,

* et/ou en tant que biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme 1,4 β -D-glucanase, et/ou de la xyloglucane endotransglycolase.

2. Utilisation selon la revendication 1, des composés choisis parmi ceux cités dans la revendication 1, en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur

activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, telles que la protection des plantes contre les pathogènes, notamment contre les bactéries, les virus, les champignons, ou l'adaptation des plantes à un stress abiotique, notamment l'adaptation au froid ou à des teneurs élevées en ozone.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, des polymères 1,4 β -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

4. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, des polymères 1,4 β -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, R représente H ou COCH₃, le pourcentage de COCH₃ en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

5. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, d'oligosaccharides glycuroniques à enchaînement β (1-4), tels que les oligo 1,4 β -D-glucuronanes, les oligo 1,4 β -D-mannuronanes, et les oligo 1,4 β -D-guluronanes, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

6. Utilisation selon la revendication 5, des oligosaccharides glycuroniques choisis parmi les suivants:

- les oligo 1,4 β -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4 β -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4 β -D-guluronane de DP4.

7. Utilisation selon la revendication 1, des composés choisis parmi ceux cités dans la revendication 1, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou de l'enzyme 1,4 β -D-glucanase, et/ou de la xyloglucane endotransglycolase.

8. Utilisation selon la revendication 7, des composés choisis parmi ceux cités dans la revendication 1, en tant que produits biofertilisants dans le cadre du contrôle d'une ou plusieurs étapes de développement des plantes, tels que le contrôle de la maturation des fruits, de l'abscission, de la croissance du pistil ou de la maturation des anthères, et/ou du contrôle de l'organisation des parois cellulaires au cours de l'expansion des tissus, et/ou pour renforcer les parois végétales et les adapter à des stimuli environnementaux.

9. Utilisation selon la revendication 7 ou 8, des oligo 1,4 β -D-glucuronanes, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase et de l'enzyme 1,4 β -D-glucanase, dans le cadre du contrôle d'une ou plusieurs étapes de développement des plantes, tels que le contrôle de la maturation des fruits, de l'abscission, de la croissance du pistil ou de la maturation des anthères.

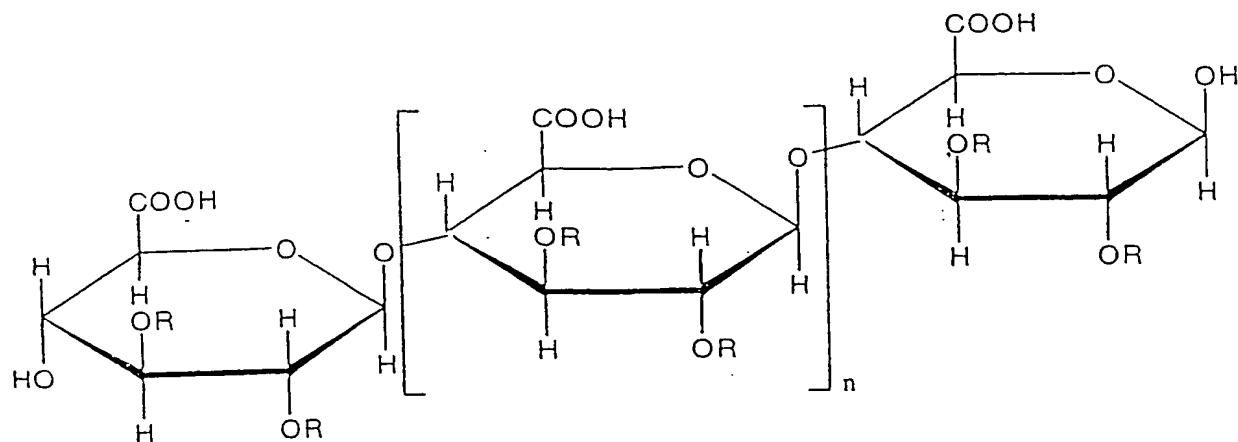
10. Utilisation selon la revendication 9, de l'oligo 1,4 β -D-glucuronane de DP moyen 8.

11. Utilisation selon la revendication 7 ou 8, des oligo 1,4 β -D-mannuronanes, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme xyloglucane endotransglycolase, dans le cadre du contrôle de l'organisation des parois cellulaires au cours de l'expansion des tissus, et/ou pour renforcer les parois végétales et les adapter à des stimuli environnementaux.

12. Utilisation selon la revendication 11, de l'oligo 1,4 β -D-mannuronane de DP 4.

13. Produits phytosanitaires et/ou biofertilisants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un composé choisi parmi :

- les polymères 1,4 β -D-glucuronanes de formule (I) suivante :



dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou $COCH_3$,

- et/ou les oligosaccharides glycuroniques à enchaînement $\beta(1-4)$ dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques glycuroniques susmentionnés.

14. Produits phytosanitaires selon la revendication 13, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un polymère 1,4 β -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H .

15. Produits phytosanitaires selon la revendication 13, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligosaccharide glycuronane à enchaînement $\beta(1-4)$, tels que les oligo 1,4 β -D-glucuronanes, les oligo 1,4 β -D-mannuronanes, et les oligo 1,4 β -D-guluronanes, dont le DP est inférieur à 20, et de préférence compris entre 5 et 15.

16. Produits phytosanitaires selon la revendication 15, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligosaccharide glycuronique choisi parmi les suivants :

- les oligo 1,4 β -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4 β -D-mannuronane de DP4,

- l'oligo 1,4 β -D-guluronane de DP4.

5 17. Produits biofertilisants selon la revendication 13, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligo 1,4 β -D-glucuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, tel que l'oligo 1,4 β -D-glucuronane de DP moyen 8.

18. Produits biofertilisants selon la revendication 11, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligo 1,4 β -D-mannuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, tel que l'oligo 1,4 β -D-mannuronane de DP 4.

1 / 1

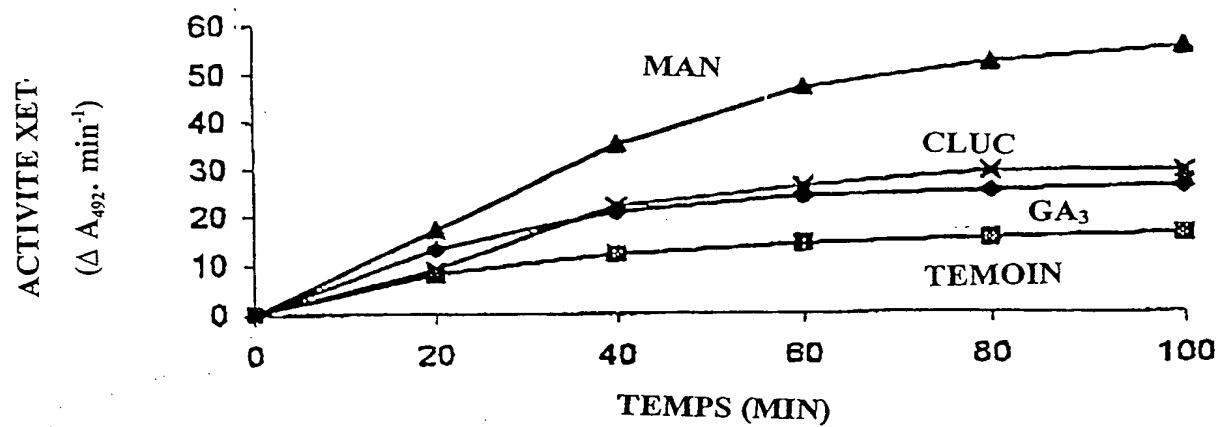


FIGURE 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A01N43/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 688 222 A (UNIV PICARDIE) 10 September 1993 (1993-09-10) cited in the application page 1, line 2 - line 12 page 5, line 12 - page 14, line 21 page 15, line 3 - line 13 ---	1-10, 13-17
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199301 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C06, AN 1993-006210 XP002134848 & JP 04 335839 A (MEIJI SEIKA KAISHA), 24 November 1992 (1992-11-24) abstract --- -/--	1,5-9, 13,15-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 2000

Date of mailing of the international search report

03/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lamers, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/FR 00/01761

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 605 185 A (MEIJI SEIKA KAISHA) 22 April 1988 (1988-04-22) page 1, line 11 - line 30 page 3, line 1 - line 17 page 4, line 6 - line 28 ---	1,5-9, 13,15-17
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 2, 29 February 1996 (1996-02-29) & JP 07 274725 A (MEIJI SEIKA), 24 October 1995 (1995-10-24) abstract ---	1,5-9, 13,15-17
X	US 4 993 185 A (ADACHI TAKASHI ET AL) 19 February 1991 (1991-02-19) column 1, line 52 -column 2, line 7 ---	1,5-9, 13,15-18
X	DATABASE CROPU 'Online! retrieved from STN-INTERNATIONAL, accession no. 1998-85656 XP002134847 abstract & JP 10 066449 A (MEIJI-SEIKA) 10 March 1998 (1998-03-10) ---	1,5-9, 13,15-18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199402 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1994-010974 XP002150689 & JP 05 316997 A (POLA CHEM IND INC), 3 December 1993 (1993-12-03) abstract & US 5 952 308 A 14 September 1999 (1999-09-14) column 4, line 8 - line 9 ---	10,15, 16,18
P,X		
A	DE 33 38 689 A (KOEHLER VALENTIN DR MED ;KOEHLER JULIAN (DE); SEIGNETTE FRANZ LEO) 9 May 1985 (1985-05-09) page 4, line 8 -page 5, line 1 ---	1-18
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199434 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1994-275523 XP002134849 & JP 06 205687 A (AOMORI KEN), 26 July 1994 (1994-07-26) abstract ---	1-18

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern 1st Application No
PCT/FR 00/01761

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; M.M.PURUGGANAN ET AL.: "The Arabidopsis TCH4 xyloglucan endotransglycosylase: Substrate specificity, pH optimum, and plant tolerance" retrieved from EPOQUE, accession no. PREV199799760116 XP002150688 abstract & PLANT PHYSIOLOGY, vol. 115, 1997, pages 181-190,</p>	1-19
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199935 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C06, AN 1999-411829 XP002150690 & JP 11 164688 A (TAKARA SHUZO CO LTD), 22 June 1999 (1999-06-22) abstract</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: al Application No

PCT/FR 00/01761

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2688222 A	10-09-1993	CA 2131384 A EP 0629245 A WO 9318174 A JP 7504928 T	16-09-1993 21-12-1994 16-09-1993 01-06-1995
JP 4335839 A	24-11-1992	JP 2663408 B	15-10-1997
FR 2605185 A	22-04-1988	JP 1892990 C JP 6017282 B JP 63215606 A JP 1749151 C JP 4033408 B JP 63101302 A CA 1332880 A CN 87107747 A, B DE 3735365 A US 5588254 A	26-12-1994 09-03-1994 08-09-1988 08-04-1993 03-06-1992 06-05-1988 08-11-1994 15-06-1988 21-04-1988 31-12-1996
JP 07274725 A	24-10-1995	NONE	
US 4993185 A	19-02-1991	JP 1749157 C JP 4033409 B JP 63226220 A ES 2009245 A	08-04-1993 03-06-1992 20-09-1988 16-09-1989
JP 10066449 A	10-03-1998	NONE	
JP 5316997 A	03-12-1993	JP 2986133 B US 5952308 A	06-12-1999 14-09-1999
DE 3338689 A	09-05-1985	NONE	
JP 6205687 A	26-07-1994	NONE	
JP 11164688 A	22-06-1999	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema 'internationale No

PCT/FR 00/01761

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A01N43/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 688 222 A (UNIV PICARDIE) 10 septembre 1993 (1993-09-10) cité dans la demande page 1, ligne 2 - ligne 12 page 5, ligne 12 -page 14, ligne 21 page 15, ligne 3 - ligne 13 ---	1-10, 13-17
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199301 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C06, AN 1993-006210 XP002134848 & JP 04 335839 A (MEIJI SEIKA KAISHA), 24 novembre 1992 (1992-11-24) abrégé ----- -/-	1,5-9, 13,15-17

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lamers, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No
PCT/FR 00/01761

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 605 185 A (MEIJI SEIKA KAISHA) 22 avril 1988 (1988-04-22) page 1, ligne 11 - ligne 30 page 3, ligne 1 - ligne 17 page 4, ligne 6 - ligne 28 ---	1,5-9, 13,15-17
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 2, 29 février 1996 (1996-02-29) & JP 07 274725 A (MEIJI SEIKA), 24 octobre 1995 (1995-10-24) abrégé ---	1,5-9, 13,15-17
X	US 4 993 185 A (ADACHI TAKASHI ET AL) 19 février 1991 (1991-02-19) colonne 1, ligne 52 - colonne 2, ligne 7 ---	1,5-9, 13,15-18
X	DATABASE CROPU 'en ligne! retrieved from STN-INTERNATIONAL, accession no. 1998-85656 XP002134847 abrégé & JP 10 066449 A (MEIJI-SEIKA) 10 mars 1998 (1998-03-10) ---	1,5-9, 13,15-18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199402 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1994-010974 XP002150689 & JP 05 316997 A (POLA CHEM IND INC), 3 décembre 1993 (1993-12-03) abrégé & US 5 952 308 A 14 septembre 1999 (1999-09-14) colonne 4, ligne 8 - ligne 9 ---	10,15, 16,18
P,X		
A	DE 33 38 689 A (KOEHLER VALENTIN DR MED ;KOEHLER JULIAN (DE); SEIGNETTE FRANZ LEO) 9 mai 1985 (1985-05-09) page 4, ligne 8 -page 5, ligne 1 ---	1-18
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199434 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1994-275523 XP002134849 & JP 06 205687 A (AOMORI KEN), 26 juillet 1994 (1994-07-26) abrégé ---	1-18

	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No

PCT/FR 00/01761

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; M.M.PURUGGANAN ET AL.: "The Arabidopsis TCH4 xyloglucan endotransglycosylase: Substrate specificity, pH optimum, and plant tolerance" retrieved from EPOQUE, accession no. PREV199799760116 XP002150688 abrégé & PLANT PHYSIOLOGY, vol. 115, 1997, pages 181-190,</p>	1-19
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199935 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C06, AN 1999-411829 XP002150690 & JP 11 164688 A (TAKARA SHUZO CO LTD), 22 juin 1999 (1999-06-22) abrégé</p>	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demar internationale No

PCT/FR 00/01761

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2688222 A	10-09-1993	CA 2131384 A EP 0629245 A WO 9318174 A JP 7504928 T	16-09-1993 21-12-1994 16-09-1993 01-06-1995
JP 4335839 A	24-11-1992	JP 2663408 B	15-10-1997
FR 2605185 A	22-04-1988	JP 1892990 C JP 6017282 B JP 63215606 A JP 1749151 C JP 4033408 B JP 63101302 A CA 1332880 A CN 87107747 A, B DE 3735365 A US 5588254 A	26-12-1994 09-03-1994 08-09-1988 08-04-1993 03-06-1992 06-05-1988 08-11-1994 15-06-1988 21-04-1988 31-12-1996
JP 07274725 A	24-10-1995	AUCUN	
US 4993185 A	19-02-1991	JP 1749157 C JP 4033409 B JP 63226220 A ES 2009245 A	08-04-1993 03-06-1992 20-09-1988 16-09-1989
JP 10066449 A	10-03-1998	AUCUN	
JP 5316997 A	03-12-1993	JP 2986133 B US 5952308 A	06-12-1999 14-09-1999
DE 3338689 A	09-05-1985	AUCUN	
JP 6205687 A	26-07-1994	AUCUN	
JP 11164688 A	22-06-1999	AUCUN	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 janvier 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/00025 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: A01N 43/16

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/01761

(22) Date de dépôt international: 23 juin 2000 (23.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:

99/08135 25 juin 1999 (25.06.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
CENTRAL NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794
Paris cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): LIENART,
Yvette [FR/FR]; Saint Nizier d'Uriage, F-38410 Uriage
(FR). HEYRAUD, Alain [FR/FR]; 6, côte de Verdaret,
F-38113 Veurey-Voroize (FR). SEVENOU, Olivier
[FR/GB]; 1 Hight Street, Kegworth DE74 2DA (GB).

(74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Gros-
set-Fournier & Demachy SARL, 20, rue de Maubeuge,
F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(48) Date de publication de la présente version corrigée:

25 mai 2001

(15) Renseignements relatifs à la correction:

voir la Gazette du PCT n° 21/2001 du 25 mai 2001, Section
II

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF GLYCURONIC POLYSACCHARIDES AND OLIGOSACCHARIDES AS PHYTOSANITARY PRODUCTS
AND/OR FERTILISERS

(54) Titre: UTILISATION DE POLYSACCHARIDES ET D'OLIGOSACCHARIDES GLYCURONIQUES EN TANT QUE PRO-
DUITS PHYTOSANITAIRES ET/OU FERTILISANTS

(57) Abstract: The invention concerns the use of compounds selected among 1,4 β -D-glucuronans, and/or glycuronic polysaccha-
rides derived from polymers of formula (I), and whereof the number of saccharide units is less than about 30, and/or esters and/or
ethers corresponding to polymers of formula (I) or said oligosaccharide derivatives, as phytosanitary products in applications related
to their activity for amplifying the 1,3 β -D-glucanase enzyme; and/or as biofertilisers in applications related to their activity ampli-
fying the 1,3 β -D-glucanase enzyme, and/or the 1,4 β -D-glucanase, and/or the xyloglucan endotransglycolase.

(57) Abrégé: L'invention a pour objet l'utilisation de composés choisis parmi les polymères 1,4 β -D-glucuronanes, et/ou les oligo-
saccharides glycuroniques dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,
et/ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés, en tant
que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou
en tant que biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3 β -D-glucanase, et/ou de
l'enzyme 1,4 β -D-glucanase, et/ou de la xyloglucane endotransglycolase.

WO 01/00025 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)